



УДК 594.124:577.115(262.5)

© 2010

А. В. Бородина, М. В. Нехорошев, Т. Маока, А. А. Солдатов

Состав каротиноидов гонад брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes)

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

Вивчений склад каротиноїдів гонад Rapana venosa. Сумарний рівень цих сполук у самців був на порядок вище, ніж у самок ($81,42 \text{ мг} \cdot 100^{-1}$ г сирової маси). Дослідження якісного складу дозволило виділити 8 видів каротиноїдів: β -каротин, зеаксантин, діатоксантин, алоксантин, (9Z)-алоксантин, (9Z,9'Z)-алоксантин, 7,8-дидегідроастаксантин, 4-кето-алоксантин, що становить близько 99% їх сумарного вмісту. Основним є алоксантин. На його стереоізомери і складні ефіри припадає більше 94% суми усіх пігментів. Відзначений також високий вміст складних ефірів каротиноїдів (більше 40%). Відмінностей в якісному складі каротиноїдів самців і самок не виявлено. На підставі отриманих результатів і аналізу літератури авторами запропонована метаболічна схема трансформації каротиноїдів у тканинах R. venosa.

Каротиноиды — группа высокомолекулярных соединений, активно аккумулируемых тканями двустворчатых моллюсков-фильтраторов в процессе внешнего питания [1]. Считается, что это связано с их антиоксидантными свойствами, которые позволяют нейтрализовать активные формы кислорода и свободные радикалы [2]. Показано, что качественный состав каротиноидов может подвергаться направленной метаболической трансформации в тканях моллюсков — от фукоксантина, основного каротиноида микроводорослей до его различных производных, образующихся в тканях морских организмов и не встречающихся в водорослях. Такими каротиноидами являются аллоксантин, митилоксантин и изомитилоксантин [3].

Особый интерес представляет не только процесс трансформации каротиноидов в теле первичных потребителей органического вещества, которыми являются фильтрующие формы моллюсков, но и их дальнейшее преобразование в трофической цепи. *Rapana venosa* — брюхоногий моллюск, который является терминальным звеном в пищевой цепи и основным потребителем черноморских двустворок [4]. Ткани ее содержат достаточно высокий уровень

каротиноидов [4], однако их качественный состав не исследован. Изучению этих аспектов метаболической трансформации каротиноидов и посвящена настоящая работа.

Объектами исследования служили взрослые особи *Rapana venosa* (Valenciennes). Материал получали в Карадагском природном заповеднике (Крым) в августе 2008 г. У моллюсков обоих полов извлекали гонады (стадия зрелости — 4–5), которые использовали для качественного изучения состава каротиноидов. Каротиноиды экстрагировали ацетоном. Экстракт упаривали в вакууме, а остаток растворяли в хлороформе. После промывания экстракта водой определяли общее содержание каротиноидов с учетом коэффициента экстинкции $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$ при 450 нм [5].

Суммарный экстракт разделяли хроматографически на стеклянных пластинках с незакрепленным слоем силикагеля (силикагель L 5/40 μ Chemapol) и толщиной слоя 3 мм в системе ацетон-гексан (3 : 7). Параллельно применяли также колоночную хроматографию на силикагеле. В качестве элюента использовали гексан-диэтиловый эфир. Полученные фракции в дальнейшем исследовали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на колонках с обращенной фазой (ODS). Выделенные сложные эфиры каротиноидов были омылены в 10% KOH/CH₃OH при комнатной температуре в течение 2 ч. После гидролиза образцы исследовали с помощью HPLC с колонкой ODS. Спектры видимой области определяли на спектрофотометре Shimadzu U-240 в диэтиловом эфире и на Spcol⁻¹⁰ в ацетоне. Масс-спектры (FAB MS) получены на спектрометре JEOL JMS NX 110 A на матрице из мета-нитробензилового спирта. Спектры протонного магнитного резонанса (¹H NMR) (500 МГц) сняты на Varian UNITY INOVA 500 в дейтерохлороформе, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (TMS). Препаративную хроматографию проводили с помощью насоса Shimadzu LC-6AD и детектора Shimadzu SPD-6AV при длине волны 450 нм на колонке COSMOSIL 5SL-II с внутренним диаметром 4,6 мм длиной 250 мм. В качестве элюента использовали смесь ацетон-гексан в соотношении 2 : 8 при скорости потока 0,5 мл/мин или на колонке с обращенной фазой Wakosil 5C18 (ODS), где в качестве элюента использовали хлороформ-метанол в соотношении 1 : 9 при скорости 0,5 мл/мин [5, 6].

Максимальное содержание суммарных каротиноидов отмечено в гонадах самцов — 81,4 мг · 100⁻¹ г сырой массы, у самок этот показатель был существенно ниже — 8,2 мг · 100⁻¹ г сырой массы. Значения, зарегистрированные для самцов, многократно превышают величины, известные для других видов моллюсков [7, 8].

Анализ HPLC хроматограмм суммарных экстрактов показал присутствие восьми компонентов (рис. 1). После проведения реакции омыления первый и второй компоненты исчезли, что свидетельствует о присутствии среди них сложных эфиров. Для более полной идентификации каротиноидов выполнили хроматографическое разделение пигментов на незакрепленном слое силикагеля и на колонке с силикагелем. В обоих случаях было выделено три мажорных компонента. При использовании HPLC был определен качественный и количественный состав этих фракций.

Первую фракцию элюировали из колонки, используя 10%-й раствор эфира в гексане. На ODS она содержала β -каротин и сложные диэфиры аллоксантина. Сложные эфиры подвергали гидролизу. Установлено, что в состав диэфиров аллоксантина входят стереоизомеры: аллоксантин, (9Z)-аллоксантин, (9Z,9'Z)- аллоксантин в соотношении 50 : 7 : 35.

Вторую фракцию каротиноидов вымывали 50%-м раствором эфира в гексане. Результаты показали, что она состояла из моноэфиров аллоксантина. После гидролиза были получены те же три изомера аллоксантина и в том же соотношении, что и в первом случае.

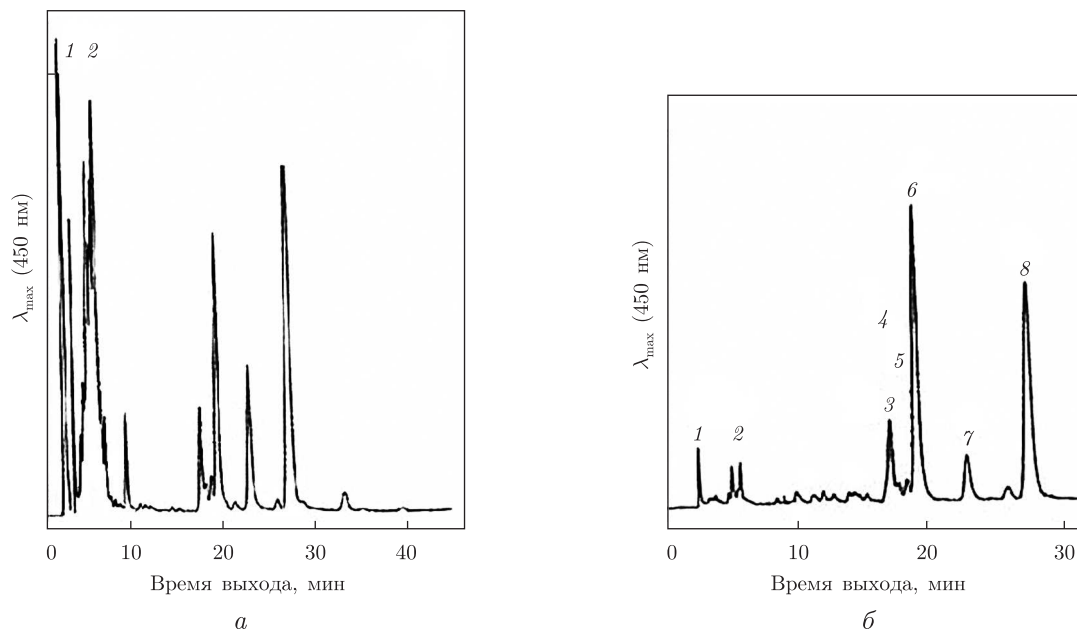


Рис. 1. HPLC хроматограмма каротиноидов гонад *Rapana venosa*: а — до омыления (пики: 1 — диэфир аллоксантина; 2 — моноэфир аллоксантина); б — после омыления (1, 2 пики отсутствуют); 3 — (9Z,9'Z)-аллоксантин; 4 — зеаксантин; 5 — диатоксантин; 6 — (all-E)-аллоксантин; 7 — 7,8-дидегидроастаксантин и 4-кетоаллоксантин); 8 — (9Z)-аллоксантин

Третью фракцию элюировали 100%-м эфиром, в ее составе выделены: зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, (9Z)-аллоксантин, (9Z,9'Z)-аллоксантин, 7,8-дидегидроастаксантин и 4-кетоаллоксантин.

Результаты изучения стереоизомеров аллоксантина сведены в табл. 1. Данные по ^1H NMR, масс-спектры и спектры видимой области подтверждают строение (all-E), (9Z), (9Z,9'Z) — геометрических изомеров аллоксантина, описанных ранее в литературе [9–11]. Приведенные в таблице данные свидетельствуют об аналогичном положении и взаимодействии протонов в молекуле (константы расщепления ядер водорода). Каждый изомер имеет свой характерный максимум в UV-Vis области. Масс-спектры (FAB MS), несмотря на различную хроматографическую подвижность, составляли 564 M^+ .

Анализ качественного и количественного состава каротиноидов гонад рапаны (табл. 2) свидетельствует о том, что около 94% суммы этих соединений приходится на стереоизомеры аллоксантина и его моно- и диэфиры. Концентрация сложных эфиров аллоксантина составляет более 40% общей массы. Следует отметить, что сложные эфиры аллоксантина примерно в такой же концентрации были ранее обнаружены нами у другого моллюска-вселенца — *Anadara inaequalis* Br. [12]. При анализе гонад самок и самцов рапаны отличий в качественном составе не обнаружено. Структура всех каротиноидов, найденных в гонадах рапаны, приведена на рис. 2.

Следует отметить, что наряду с аллоксантином, в тканях *Rapana venosa* присутствует в незначительных количествах (около 1 %) 4-кетоаллоксантин, который не был найден ни в мидиях, ни в других изученных черноморских моллюсках. Этот каротиноид обнаружен у другого хищника — *Asteras rubens* (морской звезды), не обитающего в Черном море [13]. В связи с этим предположили, что трансформация каротиноидов в тканях рапаны может

проходить по пути, аналогичному у *Asterias rubens* [13]. Однако тот факт, что в гонадах *Rapana venosa* присутствует в незначительном количестве 4-кетоаллоксантин, в отличие от морской звезды, и доминирует концентрация изомеров аллоксантина, наводит на мысль о существовании дополнительных путей трансформации каротиноидов до аллоксантина у этого моллюска. Усвоение указанного каротиноида может проходить и непосредственно, например, из тканей мидий [14], однако мы полагаем, что этого недостаточно, чтобы составить 94% всех пигментов рапаны. Из опубликованных данных известна схема трансформации каротиноидов от фукоксантина до изомитилоксантина и аллоксантина, предложенная для мидий *M. edulis* [14]. Вероятно, существует дополнительный путь трансформации на этапе митилоксантина, поскольку изомитилоксантина в тканях мидий значительно меньше, чем митилоксантина [14]. Первоначально кетоенольная группировка митилоксантина

Таблица 1. Максимумы спектров видимой области, масс-спектров и ЯМР каротиноидов: (all-*E*)-аллоксантин, (9*Z*,9'*Z*)-аллоксантина, (9*Z*)-аллоксантина

¹ H-NMR (позиция)	Аллоксантин		(9 <i>Z</i>)-Аллоксантин		(9 <i>Z</i> ,9' <i>Z</i>)-Аллоксантин	
	UV-Vis (Et ₂ O)					
	451, 480		447, 476		445, 472	
	FAB MS (<i>m/z</i>)					
	564 M ⁺		564 M ⁺		564 M ⁺	
	Мультиплет (J, Гц)		Мультиплет (J, Гц)		Мультиплет (J, Гц)	
2	1,41	dd (12, 12)	1,48	dd (12, 12)	1,48	dd (12, 12)
2	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)
3	3,99	m	4,01	m	4,01	m
4	2,03	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)
4	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)
10	6,46	d (11)	6,30	d (11)	6,30	d (11)
11	6,52	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)
12	6,36	d (14)	6,35	d (14)	6,35	d (14)
14	6,27	m	6,25	m	6,25	m
15	6,64	m	6,62	m	6,62	m
16	1,15	s	1,19	s	1,19	s
17	1,20	s	1,25	s	1,25	s
18	1,92	s	1,97	s	1,97	s
19	2,01	s	2,00	s	2,00	s
20	1,98	s	1,93	s	1,93	s
2'	1,41	dd (12, 12)	1,41	dd (12, 12)	1,48	dd (12, 12)
2'	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)
3'	3,99	m	3,99	m	4,01	m
4'	2,03	dd (18, 10)	2,03	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)
4'	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)
10'	6,46	d (11)	6,46	d (11)	6,30	d (11)
11'	6,52	dd (14, 11)	6,52	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)
12'	6,36	d (14)	6,36	d (14)	6,35	d (14)
14'	6,27	m	6,27	m	6,25	m
15'	6,64	m	6,64	m	6,62	m
16'	1,15	s	1,15	s	1,19	s
17'	1,20	s	1,20	s	1,25	s
18'	1,92	s	1,92	s	1,97	s
19'	2,01	s	2,01	s	2,00	s
20'	1,98	s	1,98	s	1,93	s

Примечание. s — синглет, d — дуплет, m — мультиплет.

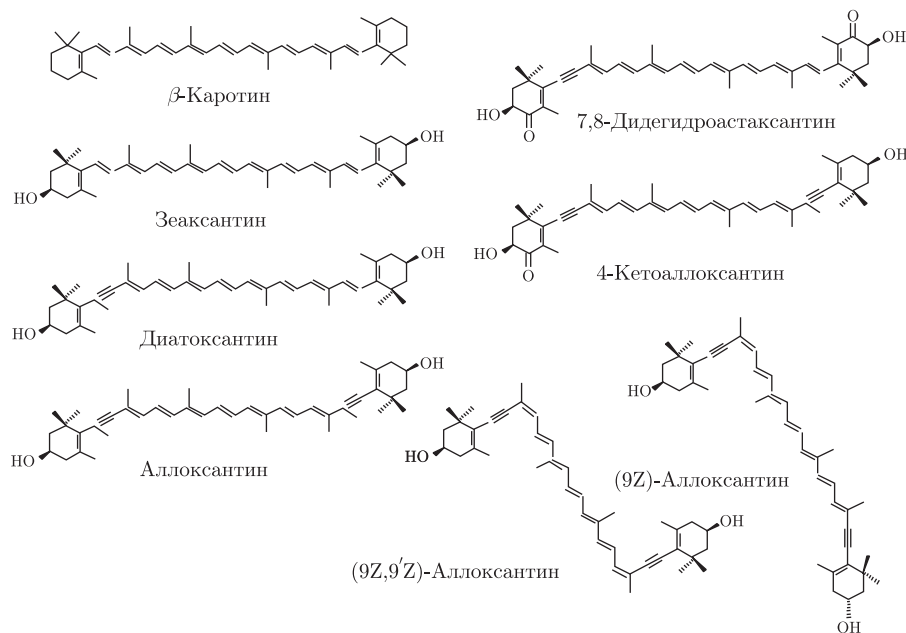


Рис. 2. Структурные формулы идентифицированных каротиноидов гонад *Rapana venosa*

(на рис. 3 она выделена в квадратных скобках) изомеризуется в диоксиалленовую. Затем происходит свободнорадикальное расщепление двух оксигрупп и циклопентановой связи. В последующем из алленовой группы образуются ацетиленовая группа, что известно для моллюсков [14, 15], и циклогексановое кольцо. Из двух гидроксильных радикалов образуется пероксид водорода, который разрушается в теле моллюска под действием каталазы. В результате молекулярная масса митилоксантина за счет метаболической реакции превращения в аллоксантин уменьшается на 34 единицы, т. е. массу пероксида водорода.

Таким образом, в гонадах брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes) обнаружено восемь видов каротиноидов: β -каротин, зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, (9Z)-аллоксантин, (9Z,9'Z)-аллоксантин, 7,8-дидегидроастаксантин, 4-кетоаллоксантин, что составляет более 99% всех пигментов. Отличительной особенностью данного вида является присутствие изомеров аллоксантина, которые с учетом его сложных эфиров (более 40%)

Таблица 2. Состав каротиноидов гонад *Rapana venosa*

Виды каротиноидов	Процентное соотношение
β -Каротин	1,0
Диэфир аллоксантина	13,4
Моноэфир аллоксантина	26,9
Зеаксантин	1,0
Диатоксантин	1,1
Аллоксантин	23,0
(9Z)-Аллоксантин	18,0
(9Z,9'Z)-Аллоксантин	13,0
7,8-Дидегидроастаксантин	1,0
4-Кетоаллоксантин	1,0
Не идентифицированные пигменты	0,6

Примечание. Соотношение (all-E)-аллоксантина, (9Z)-аллоксантина и (9Z,9'Z)-аллоксантина 50 : 7 : 35.

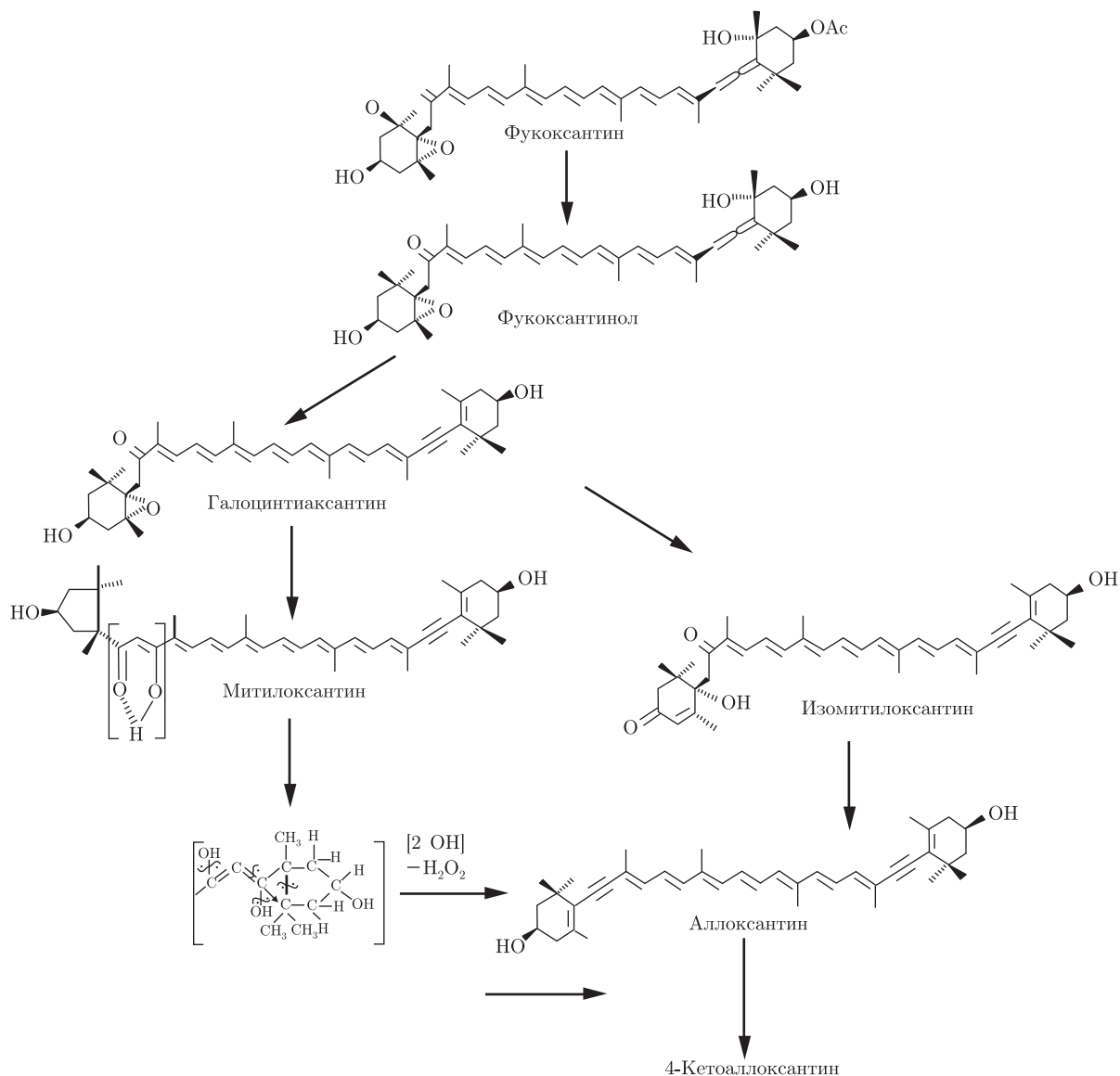


Рис. 3. Схема путей метаболизма фукоксантина в организме *R. venosa*

составляют более 94% общей суммы каротиноидов. Предложена схема трансформации каротиноидов по свободнорадикальному пути от митилоксантина до аллоксантина.

1. *Liaaen-Jensen S.* Chapter 8: Carotenoids in Food Chains // *Carotenoids. Vol. 3. Biosynthesis* / Eds. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel: Birkhäuser, 1998. – P. 360–371.
2. *Liaaen-Jensen S.* Natural Functions // *Carotenoids. Vol. 4* / Eds. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel: Birkhäuser, 2008. – P. 137–140.
3. *Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N.* Structure of New Carotenoids with a 3,4-Dihydroxy- β -End Group from the Oyster *Crassostrea gigas* // *Notes Chem. Pharm. Bull.* – 2005. – **53**, No 9. – P. 1207–1209.
4. *Gaevskaya A. V.* Parasite, diseases and pests of mussels (*Mytilus*, *Mytilidae*). II. Mollusca. – Sevastopol: EKOSI-Gigrofizika, 2006. – 100 p.
5. *Maoka T., Akimoto N.* Natural Product Chemistry in Carotenoid Some Experimental Techniques for Structural Elucidation and Analysis of Natural Carotenoids // *Carotenoid Science.* – 2008. – **13**. – P. 10–17.

6. Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Carotenoids in Three Species of *Corbicula Clams*, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula sp.* (Chinese Freshwater Corbicula Clam) // J. Agric. Food Chem. – 2005. – **53**. – P. 8357–8364.
7. Лукьянова О. Н., Шмидт Т. Я. Концентрация каротиноидов у морских беспозвоночных в условиях загрязнений // Биология моря. – 1993. – № 2. – С. 92–101.
8. Tewari A., Joshi H. V., Raghunathan C. et al. Effect of heavy metal pollution on growth, carotenoid content and bacterial flora in the gut of *Perna viridis* (L.) in situ condition // Curr. Sci. – 2001. – **81**, No 7. – P. 819–828.
9. Englert G. NMR Spectroscopy // Carotenoids. Vol. 1 / Eds. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel: Birkhäuser, 1995. – P. 147–160.
10. Cheng J. Y., Don-Paul M., Antia N. J. Isolation of an unusually stable cis-isomer of alloxanthin from a bleached autolysed culture of *Chroomonas salina* grown photoheterotrophically on glycerol. Observations on cis-trans isomerization of alloxanthin // J. Protozool. – 1974. – **21**, No 5. – P. 761–768.
11. Fiksdahl A., Hallenstvet M., Bèress L., Liaaen-Jensen S. Animal Carotenoids 18. Identity of Sulcatoxanthin and Peridin in // Biochem. Syst. and Ecol. – 1979. – **7**. – P. 173–174.
12. Бородина А. В., Нехорошев М. В., Солдатов А. А. Каротиноидный состав тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Br. – вселенца в Черное море // Экология моря. – 2008. – Вып. 76. – С. 34–39.
13. Liaaen-Jensen S. Marine carotenoids – selected topics // New J. Chem. – 1990. – **14**, No 10. – P. 747–759.
14. Partali V., Tangen K., Liaaen-Jensen S. Carotenoids in food chain studies – III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (Edible mussel) // Comp. Biochem. and Physiol. – 1989. – **92B**, No 2. – P. 239–246.
15. Matsuno T. Aquatic animal carotenoids // Fish. Sci. – 2001. – **67**. – P. 771–783.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь
НИИ развития производства продуктов питания
и химии, Киото, Япония

Поступило в редакцию 26.01.2010

A. V. Borodina, M. V. Nekhorochev, T. Maoka, A. A. Soldatov

Composition of gonads carotenoids of mollusks *Rapana venosa* (Valenciennes)

The gonads carotenoids composition of R. venosa has been studied. The total concentration of carotenoids in these males is about 10-fold higher than that in females (81.42 mg · 100⁻¹ g of dry weight). Studies of a high-quality composition allowed to distinguish 8 types of carotenoids: β-carotene, zeaxanthin, diatoxanthin, (all-E)-alloxanthin, (9Z)-alloxanthin, (9Z,9'Z)-alloxanthin, 7,8-didehydroastaxanthin, 4-ketoalloxanthin which make about 99% of the total concentration of pigments. Alloxanthin is a basic carotenoid. These stereo isomers and esters of alloxanthin constituted 94% of the sum of all pigments. The high content of carotenoids esters (more than 40%) has been evaluated also. No differences are discovered in the high-quality carotenoids composition for males and females. On the basis of the obtained results and the analysis of literature data, authors suggested a metabolic scheme of the transformation of carotenoids in tissues of R. venosa.